

GENE FRAGMENT TO CODE ANTI-HIV ANTIBODY VARIABLE RANGE, ANTI-HI CHIMERA ANTIBODY MANIFESTED BY USING THE SAME FRAGMENT AND PRODUCTION THEREOF

Publication number: JP2002352

Publication date: 1990-01-08

Inventor: MAEDA HIROAKI; EDA YASUYUKI; KURUMI KAZUHIKO; TOKIYOSHI YUKIO; MATSUSHITA SHUZO; HATTORI TOSHIO; TAKATSUKI KIYOSHI

Applicant: CHEMO SERO THERAPEUT RES INST

Classification:

- International: C12P21/08; A61K39/42; A61P31/12; C07K16/10; C12N5/10; C12N15/09; A61K38/00; C12R1/91; C12P21/08; A61K39/42; A61P31/00; C07K16/08; C12N5/10; C12N15/09; A61K38/00; (IPC1-7): C12N5/00; C12N5/20; C12N15/00; C12N15/13; C12P21/08

- European: C07K16/10K1D

Application number: JP19880171385 19880708

Priority number(s): JP19880171385 19880708; JP19880020255 19880130

Also published as:

EP0327000 (A2)
EP0327000 (A3)
EP0327000 (B*)
AU613699B (B)

Report a data error here

Abstract of JP2002352

PURPOSE: To obtain the subject gene fragment to code an anti-HIV antibody V range, useful for preparing an anti-HIV chimera antibody, comprising a gene to code H chain containing a gene to code a specific amino acid sequence in part of the gene. CONSTITUTION: A gene fragment to code an anti-HIV antibody V range, comprising a gene to code H chain containing a gene to code an amino acid sequence of (a) Thr Tyr Pro Ile Glu (b) Asn Phe His Pro Tyr Ser Asp Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly (c) Thr Gly Ser Ala Tyr Ala (d) Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser part of the gene. One example of the gene fragment is shown by the figure.

Met Ala Trp Ile Ser Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Ile
Gly Val His Ser Gln Val Glu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Leu
Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Phe Gly
Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Pro Ile Gly Trp Met Lys Gln Asn His
Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Asn Phe His Pro Tyr Ser Asp
Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Lys Leu Thr
Val Glu Lys Ser Ser Thr Val Tyr Leu Glu Phe Ser Arg Leu
Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ile His Tyr Gly
Ser Ala Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
Val Ser Ser

はN米アミノ酸: は本発明の精製配列

Data supplied from the [esp@cenet](http://v3.espacenet.com/textdoc?DB=EPODOC&IDX=JP2002352&F=0) database - Worldwide

⑫ 公開特許公報(A)

平2-2352

⑮Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬公開 平成2年(1990)1月8日

C 12 N 15/13

ZNA

5/20

C 12 P 21/08

6712-4B※

審査請求 未請求 請求項の数 11 (全22頁)

⑭発明の名称 抗HIV抗体可変領域をコードする遺伝子断片およびこれらを用いて発現された抗HIVキメラ抗体ならびにその製法

⑯特 願 昭63-171385

⑰出 願 昭63(1988)7月8日

優先権主張 ⑱昭63(1988)1月30日⑲日本(JP)⑳特願 昭63-20255

⑳発 明 者 前 田 浩 明 熊本県熊本市武蔵ヶ丘2-142 公団4-609

㉑発 明 者 江 田 康 幸 熊本県菊池郡合志町大字豊岡2012-88

㉒発 明 者 来 海 和 彦 熊本県熊本市京町本丁4-60

㉓発 明 者 時 吉 幸 男 熊本県熊本市若葉3丁目14-19

㉔出 願 人 財団法人 化学及血清 療法研究所 熊本県熊本市清水町大窪668番地

㉕代 理 人 弁理士 筒 井 知
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

抗HIV抗体可変領域をコードする遺伝子断片およびこれらを用いて発現された抗HIVキメラ抗体ならびにその製法

2. 特許請求の範囲

(1) 抗HIV中和活性を持つ免疫グロブリンのH鎖可変領域をコードする遺伝子断片であって、少なくとも下記の(a)~(d)のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列をその一部に持つ遺伝子断片。

(a) Thr Tyr Pro Ile Glu

(b) Asn Phe His Pro Tyr Ser Asp Asp Thr Asn

Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly

(c) Tyr Gly Ser Ala Tyr Ala

(d) Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val

Thr Val Ser Ser

(2) 該遺伝子断片が、下記のアミノ酸配列をコードする遺伝子を含むものである前記第(1)項記載の遺伝子断片。

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys
Lys Ala Phe Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Pro
Ile Glu Trp Met Lys Gln Asn His Gly Lys Ser
Leu Glu Trp Ile Gly Asn Phe His Pro Tyr Ser
Asp Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly
Lys Ala Lys Leu Thr Val Glu Lys Ser Ser Ser
Thr Val Tyr Leu Glu Phe Ser Arg Leu Thr Ser
Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ile His
Tyr Gly Ser Ala Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

(3) 該遺伝子断片が、下記のアミノ酸配列を含む前記第(2)項記載の遺伝子断片。

CAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAG CTG
GTG AAG CCT GGG GCC TCA GTG AAG ATG TCC TGC
AAG GCT TTT GGC TAC ACC TTC ACT ACC TAT CCA
ATA GAG TGG ATG AAA CAG AAT CAT GGG AAG AGC
CTA GAG TGG ATT GGA AAT TTT CAT CCT TAC AGT
GAT GAT ACT AAC TAC AAT GAA AAA TTC AAG GGC
AAG GCC AAA TTG ACT GTA GAA AAA TCC TCT AGC
ACA GTC TAC TTG GAG TTC AGC CGA TTA ACA TCT

GAT GAC TCT GCT GTT TAT TAC TGT GCA ATA CAC
TAC GGT AGT GCC TAC GCT ATG GAC TAC TGG GGT
CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA G

(4) 抗HIV中和活性を持つ免疫グロブリンのL鎖可変領域をコードする遺伝子断片であって、少なくとも下記の(a)～(d)のアミノ酸配列をコードする遺伝子をその一部に持つ遺伝子断片。

(a) Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly
Asp Ser Tyr Met Asn

(b) Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

(c) Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro

(d) Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu
Ile Lys

(5) 該遺伝子断片が、下記のアミノ酸配列をコードする遺伝子を含むものである前記第(4)項記載の遺伝子断片。

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu
Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser
Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly
Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

(7) H鎖並びにL鎖の定常領域がヒト免疫グロブリン由来のアミノ酸配列であり、さらにH鎖並びにL鎖の可変領域がそれぞれ下記に示された(a)～(d)のアミノ酸配列をその一部に有するアミノ酸配列からなることを特徴とする抗HIVキメラ抗体。

[H鎖可変領域に含まれるアミノ酸配列]；

(a) Thr Tyr Pro Ile Glu

(b) Asn Phe His Pro Tyr Ser Asp Asp Thr Asn
Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly

(c) Tyr Gly Ser Ala Tyr Ala

(d) Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
Thr Val Ser Ser

[L鎖可変領域に含まれるアミノ酸配列]；

(a) Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly
Asp Ser Tyr Met Asn

(b) Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

(c) Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro

(d) Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu
Ile Lys

(8) H鎖及びL鎖の可変領域のアミノ酸配列が、そ

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala
Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe
Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu
Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro
Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
Lys

(6) 該遺伝子断片が、下記の遺伝子を含む配列である前記第(5)項記載の遺伝子断片。

GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCT TTG
GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCC
TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT
GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA
GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT GCT GCA
TCC AAT CTA GAA TCT GGG ATT CCA GCC AGG TTT
AGT GGC AGT GGG TCT AGG ACA GAC TTC ACC CTC
AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA
ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AAT GAG GAT CCA
TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAG TTG GAA ATA
AAA C

れぞれ下記のアミノ酸配列である前記第(7)項記載の抗HIVキメラ抗体。

[H鎖可変領域]；

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu
Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys
Lys Ala Phe Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Pro
Ile Glu Trp Met Lys Gln Asn His Gly Lys Ser
Leu Glu Trp Ile Gly Asn Phe His Pro Tyr Ser
Asp Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly
Lys Ala Lys Leu Thr Val Glu Lys Ser Ser Ser
Thr Val Tyr Leu Glu Phe Ser Arg Leu Thr Ser
Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ile His
Tyr Gly Ser Ala Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

[L鎖可変領域]；

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu
Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser
Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly
Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala

Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe
Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu
Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro
Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
Lys

(9) 前記第(1)項記載の遺伝子断片の下流(3'側)にヒト免疫グロブリンのH鎖定常領域をコードする遺伝子断片を連結させた抗HIVキメラ抗体H鎖をコードする遺伝子と、その上流にプロモーターを有する発現ベクター、及び前記第(4)項記載の遺伝子断片の下流にヒト免疫グロブリンのL鎖定常領域をコードする遺伝子断片を連結させた抗HIVキメラ抗体L鎖をコードする遺伝子と、その上流にプロモーターを有する発現ベクターとにより共形質転換されたミエローマ細胞からなる形質転換体。

(10) 前記第(1)項記載の遺伝子断片の下流(3'側)にヒト免疫グロブリンのH鎖定常領域をコードする遺伝子断片を連結させた抗HIVキメラ抗体H鎖をコードする遺伝子、及び前記第(4)項記載の遺伝子断

有効なH鎖及びL鎖の可変領域をコードする遺伝子断片、これらを組み込んだ形質転換体、これらを用いて発現された抗HIVキメラ抗体並びにその製法に関する。

発明の背景

今世紀最大の奇病と形容され、注目を浴びている後天性免疫不全症候群(acquired immune deficiency syndrome: AIDS)は、レトロウイルスに属するヒト免疫不全ウイルス(HIV)に起因するウイルス性疾患である。この疾患は、1981年アメリカCDCの週報にロスアンゼルス男性同性者5人にカリニ肺炎が発症したことに端を発する[Centers for Disease Control: MMWR, 30, p250, (1981)]。その後、この病気はまたたく間に世界中に広がり、世界保健機構(WHO)の集計によれば、1987年8月12日時点においてすでに122ヶ国に発生が認められ、患者総数は6万人を越している。わが国においても1987年9月4日時点で50人の患者が確認され、そのうち28人はすでに死亡している。AIDSがこのように急速に世界中に広がりを見せているにもかかわらず

片の下流にヒト免疫グロブリンのL鎖定常領域をコードする遺伝子断片を連結させた抗HIVキメラ抗体L鎖をコードする遺伝子の上流にそれぞれプロモーターを有する発現ベクターにより形質転換されたミエローマ細胞からなる形質転換体。

(11) 前記第(1)項記載の遺伝子断片の下流(3'側)にヒト免疫グロブリンのH鎖定常領域をコードする遺伝子断片を連結させた抗HIVキメラ抗体H鎖をコードする遺伝子と、前記第(4)項記載の遺伝子断片の下流にヒト免疫グロブリンのL鎖定常領域をコードする遺伝子断片を連結させた抗HIVキメラ抗体L鎖をコードする遺伝子とを同時にマウスミエローマ細胞で発現・分泌させ、これを回収することを特徴とする抗HIVキメラ抗体の製法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明はヒト免疫不全ウイルス(HIV)に起因するエイズ(AIDS)の治療および予防に期待できる新規な抗HIVキメラ抗体に関する。さらに詳細には、HIVに対し中和抗体を有する抗HIVキメラ抗体の発現に

わらず本病の予防法及び治療法はほとんど確立されていない。

抗HIV剤として、唯一実用化されているものとしてアジドチミジン(AZT)がある[Nature: 326, p430, (1987)]。これは、制ガン剤として合成されたものであり、HIVの逆転写酵素阻害作用に基づく抗HIV剤であるが、生体の造血組織に対する強い毒性を有するため、多くの例で貧血をもたらすことがわかっている。その他、多くの物質が、抗HIV剤の候補として研究が行われているが、有効であり且つ安全な抗HIV剤はまだ開発されているとは言えない。一方、本病予防のためのワクチン開発に関しても盛んに研究が行われているが、これまでに実用可能なワクチン開発に成功したというような報告もない。

このような状況の中で、輸血によってHIV陽性となったサラセミアの患者グループと小児のAIDS及びARC(AIDS関連症候群)のグループについてその臨床と中和抗体の関連について報告されている[R. Guroffら, J. Immunol., 138, p3731, (1987); R.

Guroffら, *Pediatric Research*, inpress]. いずれの場合でも中和抗体の検出できる症例においては臨床症状も軽く良好であるが、中和抗体が検出できない症例においては臨床症状が悪化していることが報告されており、*in vivo*においても中和抗体が有効である可能性を示している。また、すでに感染しているヒトにも能動免疫をすべきだと主張している報告もある [Salk, J., *Nature*, 327, p473, (1987)]。

以上のように、中和活性を有する抗HIV抗体は、*in vivo*における感染の拡大防止や感染細胞の排除に役立つ可能性があり、現在、臨床で用いられている抗ウイルス剤等との併用により更に高い効果が得られることが期待される。

従来技術

上記のような抗HIV抗体として、中和活性を有するモノクローナル抗体の使用が考えられる。モノクローナル抗体作製に関する基本的な技術は、これまでにすでに確立されているが、これらは主としてマウス型モノクローナル抗体である。

に進みつつある。免疫グロブリン遺伝子は抗原との結合部位である可変領域(V領域)遺伝子と補体や特定の細胞と相互作用等に関与した生理活性を持つ定常領域(C領域)遺伝子により形成されていることがよく知られている。さらに、V領域遺伝子は、数あるV遺伝子断片群、D遺伝子断片群(L鎖ではまだ見つかっていない)及びJ遺伝子断片群の中からそれぞれ1個が選ばれこの順序で並んで結合することによって形成される。各遺伝子断片群の中でどの遺伝子断片が選ばれるかが抗体の特異性を大きく左右する。即ち、抗体の特異性はH鎖とL鎖のV領域遺伝子の中の各遺伝子断片の組合せによって決定される [利根川進, *Nature*, 307, p575 (1983); 本庶佑, *Annual Rev. Immunol.* 1, p499 (1983) 参照]。従って、ある特定の抗原に対しては、特定のH鎖L鎖のV(D)J遺伝子断片の組合せがあると考えられる。

また、このV領域遺伝子の5'上流域及び3'下流域には免疫グロブリン遺伝子の発現に重要な役割をしていると思われるDNA配列が存在する。即ち、

このようなマウス型モノクローナル抗体の医学分野における免疫学的診断、治療、予防への利用法においては生理活性(補体活性化能や抗体依存性の細胞傷害活性等)や抗原性(マウスモノクローナル抗体をヒトに使用した場合、異種タンパクとしてアナフィラキシーショックや血清病などの副作用をおこすことが考えられる)等の制約から、これらの実用に際してまだ問題が残されており、このような問題のないヒト型モノクローナル抗体への期待がよせられている。しかし、ヒト型モノクローナル抗体作製技術はマウス型モノクローナル抗体作製技術ほど進歩しておらず、現状では、特異性においてマウス型モノクローナル抗体よりも優れたヒト型モノクローナル抗体を得ることが困難な場合が多い。さらに、HIVのような危険度の高い抗原に対する抗体は、バイオハザードの面からも、モノクローナル抗体作製のためのリンパ球の原資をヒトに求めることは望ましくない。

一方、免疫グロブリン遺伝子についての解析は、最近の遺伝子操作技術の急速な発展に伴って急速

V領域遺伝子の5'上流域にはプロモーター機能を有するDNA配列が存在し、3'下流域(J遺伝子断片とC領域遺伝子の間)には免疫グロブリン遺伝子の転写効率を著しく増大させる機能を有するエンハンサーと呼ばれるDNA配列が存在する。これらの領域はマウス及びヒトの免疫グロブリン遺伝子で同定されており、そのDNA配列も明らかにされている [C. Queenら, *Cell*, 33, p741 (1983); J. Banerjiら, *Cell*, 33, p729, (1983); S. D. Gilliesら, *Cell*, 33, p717 (1983); A. C. Haydayら, *Nature*, 307, p334 (1984); L. Emorineら, *Nature*, 304, p447 (1983) 参照]。

最近、先に記したようなマウス型モノクローナル抗体とヒト型モノクローナル抗体のいずれの問題をも解決する方法として、抗原と結合する可変(V)領域はマウスモノクローナル抗体から、抗原性或は免疫原性及び生理活性に関与する定常(C)領域はヒトの抗体からなるマウス-ヒトキメラ抗体の作製が注目されており、すでにいくつかの報告が見受けられる(特開昭60-155132号、特開昭61-475

00号)。しかしながら、このようなキメラ抗体の作製には、目的の抗原と結合能を持つ抗体分子の可変領域のアミノ酸配列をコードする遺伝子を見いだすことが非常に重要な要素となっており、本発明の対象となるHIVに関しては、そのような可変領域のアミノ酸配列、ひいてはHIVに対して中和活性を有する抗体の可変領域のアミノ酸配列をコードする遺伝子を見いだすことが困難であったため、これまでにHIVに対して有効なキメラ抗体が得られたというような報告は見あたらず、ましてやHIVに対して中和活性を有する抗HIVキメラ抗体の作製に成功した例はない。

発明の目的

このような状況において、本発明者らはHIVに対して中和活性を有するモノクローナル抗体を産生する細胞(ハイブリドーマ)から、該抗体の可変領域をコードする遺伝子を分離することに成功し、さらにこれを用いてマウス-ヒトキメラ抗体の発現を試みた結果、HIVに対して中和活性を有する抗HIVキメラ抗体の作製に成功し、本発明を完成する

120)を精製し、これを免疫原として用い通常のハイブリドーマを作製する方法でハイブリドーマを作製すれば、抗HIVマウスモノクローナル抗体産生細胞を得ることが可能である。更に、このようにして得られた抗HIVマウスモノクローナル抗体産生細胞の中から、HIVに対して中和活性を有するモノクローナル抗体を産生している細胞を選択する。HIVの場合、該ウイルス特有の性質から、このような中和活性を有するモノクローナル抗体を得ることは容易なことではないが、そのような細胞株として本発明者らは、HIVに対して中和活性を有する抗体を産生するハイブリドーマ54'CB1細胞の確立に成功しており[松下修三ら、Medical Immunology, 3, p14, (1987)]、これらが本発明の以下の遺伝子調製に用いる最も好ましい細胞株として挙げられる。

本発明の可変領域をコードする遺伝子断片は、このような抗HIV中和モノクローナル抗体産生細胞より、分離され、解析された遺伝子配列である。しかしながら、前にも述べたように、このような

に至った。すなわち本発明は、これまでに一切報告されていない、抗HIV中和抗体の可変領域をコードする遺伝子を提供するものであり、これを用いて形質転換細胞内で発現される抗HIVキメラ抗体を提供するものである。さらに詳細には、本発明は、抗HIV中和活性を持つマウスモノクローナル抗体の抗原結合部位(V領域)とヒト抗体の定常領域(C領域)からなる抗HIVキメラ抗体を提供するものであり、このようにして得られる本発明の抗HIVキメラ抗体は、抗HIV中和活性を有し、かつ副作用のないAIDS診断薬、治療薬・予防薬への応用を可能にするものである。

発明の構成および効果

本発明に用いる抗HIVマウスモノクローナル抗体産生細胞は、これまでに確立されているマウスモノクローナル抗体の作製技術を用いて作製される。例えば、H9/HTLV-III Bで示されるウイルス感染細胞株(ATCC No. CRL8543)や、Molt3/HTLV-III B(ATCC No. CRL8602)等の入手可能なウイルス感染細胞より、ウイルス成はウイルス糖蛋白分画(env: gp41, gp

細胞は、目的の抗HIV抗体に特異的なV領域をコードする遺伝子の他に、数多いV領域構成遺伝子群を有している(例えば、マウス抗体の特異性を決定するVH鎖のV遺伝子群だけでも少なくとも100種以上異なる遺伝子を持ち、D遺伝子群として11種以上、J遺伝子群として4種の遺伝子を持っている。同様にVk鎖のV遺伝子群としては約300種以上の遺伝子、J遺伝子群としては4種の遺伝子を保有している)ため、細胞の持つ染色体遺伝子の中から、目的の抗HIV抗体に特異的なV領域をコードしている遺伝子を分離することが必要である。このような特異性を担っているマウス免疫グロブリンH鎖遺伝子とL鎖遺伝子の可変領域(V)遺伝子を単離する方法としては、主として2つの方法が可能である。1つは、その細胞の染色体DNAから常法[例えば、T. Maniatis "Molecular Cloning" Cold Spring Harbor Lab. (1982)参照]に従ってV領域遺伝子をクローニングする方法であり、もう一方は、その細胞のメッセンジャーRNAを材料として常法[例えば、D.M. Glover編集 "DNA cloning Vol. I" IRL

press (1985)] によりcDNAを合成しV領域遺伝子をクローニングする方法である。いずれの方法も、V領域遺伝子クローニングの為にプローブとして、すでに報告されているマウス免疫グロブリン遺伝子の核酸塩基配列[例えば、坂野ら、Nature, 286, p676, (1980); E. E. Maxら、J. Biol. Chem., 256, p5116, (1981)]を参照して合成したDNAプローブ等を利用することが出来る。また、前者の方法においては、活性型の発現可能な、即ちV(D)J遺伝子の再配列を終え、メッセンジャーRNAに転写され、さらに蛋白質に翻訳されているV領域遺伝子を同定するためのサザンハイブリダイゼーションを、抗体産生細胞とその親株の染色体DNAを用いて、常法[例えば、T. Maniatis "Molecular Cloning" Cold Spring Harbor Lab. (1982)参照]に従って行い抗体産生細胞に特異的な遺伝子を決定すれば、より速く目的のV領域遺伝子をクローニングすることが出来る。目的の遺伝子を、前者の染色体DNAから調製した場合には、遺伝子の中にイントロンと呼ばれる介在配列を含んでいる。

Ile Lys

のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列をその一部に有することが見い出された。このような上記のH鎖、L鎖に含まれるそれぞれ4種のアミノ酸配列は、抗体分子の結合能を決定する重要なアミノ酸配列と考えられ、このようなアミノ酸配列が、HIVに対する中和活性を有する抗体分子の機能と密接に関連しているものと考えられた。すなわち、本発明の抗HIVキメラ抗体は、H鎖およびL鎖の可変領域を構成するアミノ酸配列としてそれぞれ上記のアミノ酸配列をその一部に有することを特徴とする。このような抗HIV中和活性を有する抗体分子の可変領域をコードする遺伝子として、H鎖、L鎖それぞれ第6図、第8図のアミノ酸配列をコードする遺伝子断片がその好ましい一例として挙げられる。また、そのような遺伝子の具体的塩基配列の一例としては、H鎖、L鎖それぞれ第5図、第7図に示された塩基配列が挙げられる。

一方、抗HIVキメラ抗体作製に用いられるヒト免疫グロブリンH鎖遺伝子並びにL鎖遺伝子の定常領域

このようにしてクローニングされた抗HIV中和抗体を有する抗体のV領域をコードする遺伝子断片の配列と、他の抗HIV結合能を有さない抗体遺伝子とを比較し遺伝子解析を行なった結果、抗HIV抗体V領域をコードする本発明の遺伝子断片は、その特異的な遺伝子配列として、H鎖をコードする遺伝子に、

(a) Thr Tyr Pro Ile Glu

(b) Asn Phe His Pro Tyr Ser Asp Asp Thr Asn
Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly

(c) Tyr Gly Ser Ala Tyr Ala

(d) Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
Thr Val Ser Ser

のアミノ酸配列をコードする遺伝子をその一部に含み、またL鎖をコードする遺伝子に、

(a) Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly
Asp Ser Tyr Met Asn

(b) Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

(c) Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro

(d) Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu

域(C)遺伝子は、例えば ARH-77細胞株(ATCC CRL 1621)の様なヒト抗体産生細胞から同様の方法により単離することが出来る。また、C領域遺伝子はその遺伝子内で再配列を行わないので特にヒトC領域遺伝子を単離するためにヒト抗体産生細胞を使う必要はない。単離する方法としては、前述のマウスV領域遺伝子の単離の場合と同じように主として2つの方法があり、いずれの場合も、C領域遺伝子クローニングの為にプローブとして、すでに報告されているヒト免疫グロブリン遺伝子の核酸塩基配列[例えば、J. W. Ellisonら、Nuc. Acids. Res., 10, p4071, (1982); P. A. Heiterら、Cell, 22, p197 (1980)]を参照して合成したDNAプローブ等を利用することが可能である。また、C領域遺伝子の種類としては、特に γ 1鎖、 κ 鎖に限ったものではなく、 μ 鎖、 α 鎖、 γ 2~4鎖、 λ 鎖の各鎖の遺伝子でも可能である。しかし、補体活性化能、抗体依存性細胞傷害活性を期待するならば、 γ 1鎖が望ましい。

抗HIVキメラ抗体遺伝子は、H鎖遺伝子もL鎖遺伝

子も、基本的には上記2種の遺伝子断片(V領域遺伝子とC領域遺伝子)を結合させることにより構築される。さらに、遺伝子の単離法に応じて、主として2つ結合の組合せがある。即ち、染色体DNAから単離したVとC領域遺伝子、cDNAから単離したVとC領域遺伝子の組合せである。

例えば、マウス染色体DNAから単離したV領域遺伝子を、ヒト染色体DNAから単離したC領域遺伝子と結合させた場合、マウスV領域遺伝子には発現に必要なプロモーターやエンハンサー等の発現調節領域を含んでいることが好ましい。ただし、プロモーターやエンハンサー等はマウス由来である必要はなく、ヒト由来でもウイルス由来でも差しつかえない。また、プロモーターはV領域の5'上流域に位置し、エンハンサーはV領域遺伝子とC領域遺伝子の間に位置するのが好ましいが、エンハンサーについては必ずしもこの位置に限定されるものではない。

一方、マウスcDNAから単離したV領域遺伝子を、ヒトcDNAから単離したC領域遺伝子と結合させる場

合、その結合部分は適当な制限酵素サイトや、必要であれば適当な合成リンカーを用いて、V領域遺伝子のコードしているアミノ酸配列とC領域遺伝子のコードしているアミノ酸配列がずれないように、またV領域アミノ酸配列とC領域アミノ酸配列が変化しないよう結合しなければならない。さらに、動物細胞中で発現を可能にするための適当なプロモーターやエンハンサー等の発現調節領域を遺伝子の5'上流域に付加してやる必要がある。

このようにして作製したキメラ抗体遺伝子を、例えばpSV2-gpt[R. C. Mulliganら、Proc. NAS. USA, 78, p2027 (1981)], pSV2-neo[P. J. Southernら、J. Mol. Appl. Genet., 1, p327 (1982)]等の選択マーカーの付いた適当なベクタープラスミドに、或は、宿主細胞内でプラスミド状態で増殖できるウイルス遺伝子の一部(パピローマウイルスなど)を持ったベクタープラスミドに、H鎖遺伝子とL鎖遺伝子を別々に、あるいは同時に組み込み、キメラ抗体遺伝子プラスミドを構築することが望ましい。

抗HIVキメラ抗体を得るためには、このようにして調製されたキメラ抗体遺伝子を含むプラスミドを用いて宿主動物細胞を形質転換することが必要である。宿主動物細胞としては、不死化されたマウスおよび他の動物細胞、好ましくはBリンパ系細胞株[例えばP3X63Ag8-653(ATCC CRL 1580)、P3X63Ag8U-1(ATCC CRL 1597)、P3/NS1/1-Ag4-1(ATCC CRL18)、Sp2/0-Ag12(ATCC CRL 1581)等の形質細胞腫、ハイブリドーマ]である。DNAによる細胞の形質転換方法としては、DEAE-デキストラン法、燐酸カルシウム共沈降法、プロトプラスト融合法、エレクトロポレーション法等の方法[例えばB. D. Hamesら編集「Transcription and Translation」IRL Press (1984)参照]があり、いずれの方法でもよい。H鎖とL鎖のキメラ抗体遺伝子を同時に持つプラスミドで形質転換を行う場合には選択マーカーは1種類でよいが、H鎖L鎖別々の場合には2種類のマーカーが必要である。この場合には1つのプラスミドで形質転換を行った後に、さらにもう一方のプラスミドで形質転換を行う二重形質転換法

を用いるのが好ましい。

このようにして形質転換された細胞を通常のハイブリドーマと同じ適当な条件下(例えば、10%牛胎児血清を含むRPMI-1640培地中)で培養すれば、この細胞から通常のハイブリドーマの産生する抗体と同様に抗HIVキメラ抗体が分泌産生される。このキメラ抗体は通常の抗体と同様な方法により精製することが出来る。

このようにして得られる本発明のキメラ抗体は、HIVに対して中和活性を有していることが確認され、本発明により、これまでになかった抗HIVキメラ抗体を調製することが可能となる。このような抗HIVキメラ抗体は、AIDSの臨床において、これまでになかった実質的に有効なAIDS治療剤となりうるものである。さらに、本発明により提供される抗HIV抗体可変領域をコードする遺伝子断片は、HIVに対して中和活性を有する抗体分子の可変領域の特異的アミノ酸配列もしくはDNA配列を開示するものであり、今後、さらに進んだ遺伝子組換え技術を用いて目的の抗体分子を修飾、または一部置換等

することにより、より優れた抗HIV中和抗体を有する組換え抗体分子の発現を可能にするものである。

次に、その実施例を示すが、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例

(1) 抗HIVマウスモノクローナル抗体の作製

抗HIVマウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製方法は以下に示す通りである。即ち、加熱不活化した精製ウイルス(HTLV-III B)及びConA-セファローズ(ファルマシア社)とイムノアフィニティセファローズを組み合わせて精製したウイルス糖蛋白分画を免疫原として用いて、BALB/cマウスを4回免疫後、脾細胞を採取し、X63マウスミエローマ細胞とポリエチレングリコール(シグマ社)を用いて細胞融合を行いクローニングした。得られたクローンの培養上清中の抗体のHTLV-III B蛋白への結合活性を酵素抗体法にて測定し、反応が陽性と思われるクローンについて、さらに、ウェスタンブロット法及び間接蛍光法を用いて確認し、抗HIVモノクローナル抗体(0.5 β 抗体)を産生

するハイブリドーマ、54'CB1細胞を確立した[松下修三ら、Medical Immunology, 3, p14, (1987)]。

該モノクローナル抗体(0.5 β 抗体)の認識する分子は、交差免疫沈降法にてHIVに感染したヒトの血清中にある抗gp120抗体が認識する分子と同一のものであることが確認され、0.5 β 抗体はHIVの外被蛋白gp120に対するモノクローナル抗体であることが証明されている。又、0.5 β 抗体はHIV感染細胞と非感染CD4陽性細胞間の合胞体形成(syncytium formation)を抑制する。さらに、0.5 β 抗体とHIVウイルスを混和し細胞(H9)へ感染させるウイルス中和試験において、0.5 β 抗体は100ng/mlという低濃度で感染を阻止することがわかっている。

以下に述べる本発明の抗HIVキメラ抗体のV領域遺伝子の調製には、該中和活性を有する抗HIVマウスモノクローナル抗体(0.5 β 抗体)を産生する54'CB1細胞を使用した。

(2) 抗HIV抗体を産生するマウスハイブリドーマからの免疫グロブリンV遺伝子の単離

マウス免疫グロブリンH鎖可変(VH)領域遺伝子の

単離については、以下のように行った。54'CB1細胞、X63細胞及びBALB/cマウス肝臓細胞からN. BlinとD.W. Staffordの方法[Nuc. Acids. Res., 3, p2303 (1976)]に従って染色体DNAを単離し、各染色体DNA10 μ gを制限酵素EcoRI(宝酒造製; 以下本実施例で使用した試薬は、特に断わりのない限り宝酒造製あるいは東洋紡製を使用した)で切断する。制限酵素切断DNAを電気泳動で0.7%アガロースゲルに展開し、ナイロンメンブレンフィルター(ジーンスクリーンプラス、NEN・リサーチ・プロダクト)に転写後、マウスJH領域を含んだ[³²P]標識合成DNAプローブ[坂野ら、Nature, 286, p676 (1980)]とサザンハイブリダイゼーションを行った。サザンハイブリダイゼーションの方法はジーンスクリーンプラスに付属していたマニュアルのプロトコールに従った。各細胞のDNAに検出されたバンドを比較した結果、マウスJHプローブを用いた場合、3.3kbのバンドが、54'CB1細胞に特異的なバンドとして同定された。このバンドは機能的なVH領域を含む活性な遺伝子であり、54'CB1細胞の

産生する抗HIV抗体の特異性の発現に関与する遺伝子である。分子サイズは入フェージDNAをHindIIIで切断したマーカーDNAによって算出した。

このサイズに相当するDNA断片をしょ糖密度勾配遠心[しょ糖10~40%(wt/vol)、26000rpm、18時間、15℃]により調製した。次にこのDNA断片と入gt11ベクターDNA(ストラタジーン社)のEcoRIアームとをT4DNAリガーゼにより連結させ、ストラタジーン社のキットを用いて、in vitroパッケージングを行い、54'CB1細胞のVH遺伝子ライブラリを得た。このライブラリから、BentonとDavisのブランクハイブリダイゼーション法[W. D. Benton, R. W. Davis, Science, 196, p180 (1977)参照]により、マウスJHプローブにより抗HIV抗体のVH領域遺伝子を含むクローンgH11を選択した。このクローンの制限酵素切断点地図を第1図に示す。このクローンのEcoRI挿入断片をThomasとDavisの方法[M. Thomas, R. W. Davis, J. Mol. Biol., 91, p315 (1974)参照]によりフェージDNAより単離し、以下のノーザンハイブリダイゼーションに

使用した。

54'CB1細胞、X63細胞から全RNAをグアニジウムチオシアネート法 [J. M. Ghingwinら, Biochemistry 18, p5294 (1979)] により分離し、このRNA10 μ gを電気泳動により3%ホルムアルデヒドを含む0.75%アガロースゲルに展開し、ナイロンメンブレンフィルター(ジーンスクリーンプラス)に転写後、マウスC κ 1領域を含んだ [32 P] 標識合成DNAプローブ [本庶ら, Cell, 18, p559 (1979)] あるいは gH11の [32 P] 標識EcoRI挿入断片とノーザンハイブリダイゼーションを行った。ノーザンハイブリダイゼーションの方法はジーンスクリーンプラスに付属のマニュアルのプロトコルに従った。この両プローブにより1.8kbの位置にバンドが検出された(第2図)。従って、クローンgH11は機能的なVH遺伝子構造を含んでいる。

一方、マウス免疫グロブリン κ 鎖可変(V κ)領域遺伝子の単離については、以下のように行った。54'CB1細胞、X63細胞及びBALB/cマウス肝臓細胞から染色体DNAを N. Blinと D. W. Staffordの方法に

ラトリーズ)のHindIIIアームとをT4DNAリガーゼにより連結させ、ストラタジーン社のキットを用いて、in vitroパッケージングを行い、54'CB1細胞V κ 遺伝子ライブラリィを得た。このライブラリィから、Bentonと Davisのブランクハイブリダイゼーション法を使用して、マウスJ κ プローブにより抗HIV抗体のV κ 領域遺伝子を含むクローンgL41を選択した。このクローンの制限酵素切断点地図を第3図に示す。このクローンのHindIII挿入断片をThomasとDavisの方法によりファージDNAより単離し、ノーザンハイブリダイゼーションに使用した。

54'CB1細胞、X63細胞から全RNAをグアニジウムチオシアネート法により分離し、このRNA10 μ gを電気泳動により3%ホルムアルデヒドを含む0.75%アガロースゲルに展開し、ナイロンメンブレンフィルター(ジーンスクリーンプラス)に転写後、マウスC κ 領域を含んだ [32 P] 標識合成DNAプローブ [E. E. Maxら, J. Biol. Chem., 256, p5116 (1981)] あるいは gL41の [32 P] 標識HindIII挿入断片とノーザンハイブリダイゼーションを行った。この

従って単離し、各染色体DNA10 μ gを制限酵素HindIIIで切断する。この制限酵素切断DNAを電気泳動で0.7%アガロースゲルに展開し、ナイロンメンブレンフィルター(ジーンスクリーンプラス)に転写後、制限酵素HindIII切断DNAはマウスJ κ 領域を含む [32 P] 標識合成DNAプローブ [E. E. Maxら, J. Biol. Chem., 256, p5116 (1981)] とサザンハイブリダイゼーションを行った。各細胞のDNAに検出されたバンドを比較した結果、マウスJ κ プローブを用いた場合、54'CB1細胞のHindIII切断DNAに3.6kbのバンドが、54'CB1細胞に特異的なバンドとして同定された。このバンドは機能的なV κ 領域を含む活性な遺伝子であり、54'CB1細胞の産生する抗HIV抗体の特異性の発現に関与する遺伝子である。分子サイズは入ファージDNAをHindIIIで切断したマーカーDNAによって算出した。

このサイズに相当するDNA断片をしょ糖密度勾配遠心 [しょ糖10~40% (wt/vol), 26000rpm, 18時間, 15℃] により調製した。次にこのDNA断片とCharon28ベクターDNA(ベセスダ・リサーチ・ラボ

両プローブにより1.2kbの位置にバンドが検出された(第4図)。従って、クローンgL41は機能的なV κ 遺伝子構造を含んでいる。

(3) ヒトC遺伝子の単離

抗HIVキメラ抗体に使用したヒトC κ 1領域を含んだ遺伝子、及びヒトC κ 領域を含んだ遺伝子は、ヒト培養細胞ARH77株 [ATCC CRL 1621] よりクローニングされたものであり、九州大学・生体防御医学研究所・渡邊武教授より分与された [工藤ら, Gene, 33, p181 (1985); 西村ら, Cancer Res., 47, p999 (1987)参照]。

(4) 抗HIV抗体マウスV領域遺伝子の核酸塩基配列

抗HIV抗体のVH領域の核酸塩基配列を調べるために、クローンgH11よりVH領域を含む1.4kbのDNA断片 (HincII-XbaI) を単離し、DNAポリメラーゼ・ラーゲフラグメント(宝酒造)を用いて両端を平滑末端に変えた後、pUC18ベクターのHincIIサイトに再クローニングし、挿入方向の異なる2つのクローニングを得た。これらのクローニングをそれぞれ制限酵素KpnIとBamHIで切断し、宝酒造・クロシークエンス

用デリレーションキットを用いてBamHIサイトからのデリレーションの程度が異なるデリレーションミュータントクローンを選択し、それぞれのクローンを制限酵素EcoRIとHindIIIで切断することにより長さの異なるVII遺伝子断片群を得た。これらのVII遺伝子断片群をM13mp19ベクターのEcoRI-HindIIIサイトに宝ライゲーションキットを用いて挿入した。

東洋紡インストラクマニュアルの方法に従い、JM101のコンピテント細胞を調製し、VII遺伝子群を挿入したM13mp19DNAで形質転換させ、一本鎖DNAを抽出精製した。さらにこの一本鎖DNAの核酸塩基配列決定は、タカラM13シーケンシングキットと富士・ジェンサー・ゲル・システムを用いて行った。その結果、2つのエクソンからなるVII遺伝子が確認された。第5図にその結果を示す。

塩基配列の結果から、免疫グロブリン遺伝子のプロモーターに必須であると言われているATGCCAATのオクタマー配列が存在し、V遺伝子断片、D遺伝子断片とJH4遺伝子断片が集合してVII遺伝子が形

成されていることが確認された(第5図)。さらに、この核酸塩基配列を基にエクソン部分をアミノ酸に変換したところ、このエクソンがオープンリーディングフレームをとることが示された(第6図)。また、この0.5β抗体のH鎖のN末端アミノ酸配列を「統生化学実験講座2、タンパク質の化学(上)」日本生化学会編 p313 (1987)に記載のエドマン分解法に従って解析したところ、N末端アミノ酸が何等かの形で修飾されており、解析できなかった。核酸塩基配列から推定されるN末端アミノ酸はグルタミンであり、これがピログルタミル化を受けやすいためにエドマン分解ができなかったものと思われた。

成されていることが確認された(第5図)。

一方、抗HIV抗体のV_H領域の核酸塩基配列を調べるために、クローンgL41よりV_H領域を含む2.0kbのDNA断片(BstEII-HincII)を単離し、DNAポリメラーゼ・ラジフラグメント(宝酒造)を用いて両端を平滑末端に変えた後、pUC18ベクターのHincIIサイトに再クローニングし、挿入方向の異なる2つのクローンを得た。これらのクローンを一方(正方向)

は制限酵素SacIとSmaIで切断し、もう一方(逆方向)は制限酵素SacIとAccIで切断し、宝酒造キロシーケンシング用デリレーションキットを用いてSmaIあるいはAccIサイトからのデリレーションの程度が異なるデリレーションミュータントクローンを選択し、それぞれのクローンを制限酵素EcoRIとHindIIIで切断することにより長さの異なるV_H遺伝子断片群を得た。これらのV_H遺伝子断片群をM13mp19ベクターのEcoRI-HindIIIサイトに宝ライゲーションキットを用いて挿入した。

塩基配列の結果から、免疫グロブリン遺伝子のプロモーターに必須であると言われているATTGCGATのオクタマー配列が存在し、V遺伝子断片とJ_H3遺伝子断片が集合してV_H遺伝子が形成されていることが確認された(第7図)。さらに、この核酸塩基配列を基にエクソン部分をアミノ酸に変換したところ、このエクソンがオープンリーディングフレームをとることが示された(第8図)。また、この0.5β抗体のH鎖のN末端アミノ酸配列を前述のエドマン分解法に従って解析したところ、N末端アミノ酸から5つのアミノ酸配列(アスパラギン-イソロイシン-バリン-ロイシン--スレオニン)が決定され、核酸塩基配列から推定される5個のN末端アミノ酸配列と一致した(第8図参照)。このことからこのV_H遺伝子が発現可能な遺伝子であることを確認した。

(5)抗HIV抗体活性を持つマウスVII遺伝子とヒトC_H1遺伝子を含むプラスミドpSV2-β_γ1の作製

ヒトC_H1遺伝子を含む14kbのDNA断片(XbaI-HpaI)をpUC18ベクターのXbaI-HincIIサイトに挿入し、制限酵素XbaIで切断した後、T4-DNAポリメラーゼを用いて切断面を平滑末端に変える。一方、

マウスH鎖プロモーター領域、マウスVH遺伝子及びマウスH鎖エンハンサー領域を含む3.3kbのDNA断片(EcoRI-EcoRI)の両端をT4-DNAポリメラーゼを用いて平滑末端に変え、これら2つのDNA断片同士を宝ライゲーションキットを用いて連結し、キメラ抗体H鎖遺伝子 $\beta\alpha 1$ を含むプラスミドを作製した。ついで、このプラスミドを制限酵素BamHIで切断し、アガロースゲル電気泳動により $\beta\alpha 1$ 遺伝子断片を単離する。この断片をpSV2-gptベクター[R. C. Mulliganら、Proc. NAS, USA, 78, p2072(1981)参照]のBamHIサイトに挿入し、pSV2- $\beta\alpha 1$ を作製した(第9図)。

(6)抗HIV抗体活性を持つマウスV κ 遺伝子とヒトC κ 遺伝子を含むプラスミドpSV2'- $\beta\kappa$ 及びpSV2- $\beta\kappa 2$ の作製

pSV2-neoベクター[P. J. SouthernらJ. Mol. Appl. Genet., 1, p327 (1982)参照]は、そのクローニングサイトとしてEcoRI及びBamHIサイトを持っているが、さらにHindIIIサイトもクローニングサイトとして使用できるように改造した。は

酵素HindIIIで切断し、マウス κ 鎖プロモーター領域及びマウスV κ 遺伝子を含む3.6kbのHindIII-HindIII DNA断片と宝ライゲーションキットを用いて連結し、pSV2'- $\beta\kappa$ を構築した(第10図)。

また、ヒト免疫グロブリンH鎖遺伝子のエンハンサーを利用したpSV2- $\beta\kappa 2$ も同時に構築した。マウス κ 鎖プロモーター領域及びマウスV κ 遺伝子を含む3.6kbのHindIII-HindIII DNA断片の両端をT4-DNAポリメラーゼを用いて平滑末端に変え、pUC18ベクターのHincIIサイトに挿入し、マウスV κ 遺伝子断片の5'端のHindIIIサイトをEcoRIサイトに変更した。同様にして、ヒトC κ 遺伝子を含む2.6kbのEcoRI-EcoRI DNA断片の3'端のEcoRIサイトをHindIIIサイトに変更した。次に、この両DNA断片をT4リガーゼを用いてHindIIIサイトで連結し、さらに両端のEcoRIサイトを用いて、pSV2-neoベクターのEcoRIサイトに組み込んだ。このプラスミドを制限酵素EcoRIで部分切断し、アガロースゲル電気泳動を行って2ヶ所あるEcoRIサイトの内どちらか一方が切断されたDNA断片を単離した。この

じめに、pSV2-neoベクターを制限酵素HindIIIで切断し、その切断面をT4-DNAポリメラーゼを用いて平滑末端に変え、再びT4-DNAリガーゼを用いて連結し、本来ベクターの保持しているHindIIIサイトを消失させた。次に、このベクターを制限酵素EcoRIとBamHIで切断してアガロースゲル電気泳動により約5.0kbのDNA断片を単離した後、pBR322ベクターのEcoRI-BamHIの375bp DNA断片とタカラライゲーションキットを用いて連結して、pSV2'-neoベクターを構築した。

pSV2'-neoベクターを制限酵素EcoRIとHindIIIで切断した後、マウス κ 鎖のエンハンサー領域を含む1.1kbのHindIII-EcoRI DNA断片[EcoRIサイトは本来XmnIサイトであるが、EcoRIリンカーを用いて変化させてある。この遺伝子は、九州大学・生体防御医学研究所 渡邊武教授より分与された。]と宝ライゲーションキットを用いて連結した。次に、制限酵素EcoRIで切断し、ヒトC κ 遺伝子を含む2.6kbのEcoRI-EcoRI DNA断片とタカラライゲーションキットを用いて連結した。さらに、制限

DNA断片にヒト免疫グロブリンH鎖遺伝子のエンハンサーを含む1.0kbのEcoRI-EcoRI DNA断片(MluI-HpaI DNA断片をEcoRIリンカーを用いてEcoRI-EcoRI DNA断片に変化させている。)を宝ライゲーションキットを用いて組み込み、マウスV κ 遺伝子の5'側のEcoRIサイトにエンハンサーDNA断片が挿入されたプラスミドを選別し、pSV2- $\beta\kappa 2$ を構築した(第11図)。

(7)抗HIV活性を持つマウス-ヒトキメラH鎖遺伝子とマウス-ヒトキメラL鎖遺伝子を含むプラスミドpSV2'- $\beta\alpha 1\kappa$ の作製

pSV2'- $\beta\kappa$ DNAを制限酵素BamHIで部分切断し、アガロースゲル電気泳動を行って、2ヶ所あるBamHIサイトのうちどちらか一方が切断されたDNA断片を単離した。一方、pSV2- $\beta\alpha 1$ DNAを制限酵素BamHIで切断し、アガロースゲル電気泳動を行って、マウス-ヒトキメラH鎖遺伝子を含むDNA断片を単離した。このようにして得た2つのDNA断片を宝ライゲーションキットを用いて連結させ、マウスV κ 領域内のBamHIサイトではなくpSV2'-neoベ

クター内のBamHIサイトにマウスーヒトキメラH鎖遺伝子を含むDNA断片が挿入されたプラスミドを、制限酵素切断点地図の違いにより選別した。こうして、H鎖L鎖2つのキメラ抗体遺伝子を含むプラスミドpSV2'- β 1 κ を作製した(第12図)。

(8) プラスミドpSV2'- β 1 κ 、pSV2'- β 2 κ 、及びpSV2'- β 2 κ による形質細胞腫の形質転換

pSV2'- β 1 κ 、pSV2'- β 2 κ あるいはpSV2'- β 2 κ のDNAをDEAE-デキストラン法[M. S. Neuberger, EMBO J., 2, p1317 (1983)参照]により種々の形質細胞腫であるP3X63Ag8.653(ATCC CRL 1580、P3X63Ag8U-1(ATCC CRL 1597)、P3/NS1/1-Ag4-1(ATCC CRL18)、Sp2/0-Ag12(ATCC CRL1581)細胞株[Kohlerら、Nature, 256, p495 (1975); Kohlerら Eur. J. Immunol., 6, p292 (1976)]等に導入し形質転換を行った。即ち、形質細胞腫を牛胎児血清(FCS)を含まないDMEM培地で数回洗浄した後、その 1×10^6 個の細胞を90 μ gのpSV2'- β 1 κ 、pSV2'- β 2 κ あるいは、pSV2'- β 2 κ プラスミドDNAと200 μ g/ml DEAE-デキストラン(ファルマシア)を含むDMEM2.5mlに

pSV2'- β 2 κ またはpSV2'- β 2 κ DNAを、pSV2'- β 2 κ DNAまたはpSV2'- β 2 κ で形質転換された細胞にはpSV2'- β 1DNAを、前述した方法に従ってさらに導入し、二重形質転換細胞を得た。

この中からキメラ抗体を産生している細胞を選択するために、抗ヒトIgG抗体(Cappel lab. inc.)を用いた酵素免疫測定法(EIA)を行った。即ち、抗ヒトIgG抗体(Cappel lab. inc.)をコーティングしたPVC製プラスチックプレート(Falcon3912)に二重形質転換細胞の培養上清を加え、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(Cappel lab. inc.)を反応させ、TMBZ(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン:同仁化学)で発色させて、キメラ抗体産生細胞を選択、確立した。

(9) プラスミドpSV2'- β 1 κ による形質細胞腫の形質転換

pSV2'- β 1 κ DNAをDEAE-デキストラン法[M. S. Neuberger, EMBO J., 2, p1317 (1983)参照]により種々の形質細胞腫であるP3X63Ag8.653(ATCC CRL 1580)、P3X63Ag8-U1(ATCC CRL 1597)、

30分間浮遊させる。次に、この細胞をFCSを含まないDMEMで数回洗浄した後、10%のFCSを含むRPMI-1640培地に浮遊させて、24ウェルプレートにそれぞれ1mlずつ 5×10^5 個の細胞が入るように分注し、48時間培養する。その後、pSV2'- β 1DNAを導入した場合には、6.5 μ g/mlのミコフェノール酸(シグマ社)と250 μ g/mlのキサンチン(シグマ社)と10% FCSを含むRPMI-1640培地に、pSV2'- β 2 κ またはpSV2'- β 2 κ DNAを導入した場合には、1.5 μ g/mlのジェネチシン(シグマ社)と10% FCSを含むRPMI-1640培地に取り替え、形質転換細胞をそれぞれ選択する。

次に、形質転換細胞をスライドガラス上に固定し、アセトン-エタノール(1:1)処理した後、蛍光標識抗体[FITC標識ヤギ抗ヒトIgG(γ 鎖特異性、或は κ 鎖特異性):Cappel lab. inc.]で染色して形質転換細胞の細胞質に強く特異的な蛍光染色が認められる細胞を選択し、導入したDNAがヒト γ 1鎖あるいは κ 鎖として強く発現している細胞を確立した。

次に、pSV2'- β 1DNAで形質転換された細胞には

P3/NS1/1-Ag4-1(ATCC CRL18)、Sp2/0-Ag12(ATCC CRL1581)細胞株[Kohlerら、Nature, 256, p495 (1975); Kohlerら Eur. J. Immunol., 6, p292 (1976)]等に導入し形質転換を行った。即ち、形質細胞腫を牛胎児血清(FCS)を含まないDMEM培地で数回洗浄した後、その 1×10^6 個の細胞を90 μ gのDNAと200 μ g/ml DEAE-デキストラン(ファルマシア)を含むDMEM2.5mlに30分間浮遊させる。次に、この細胞をFCSを含まないDMEMで数回洗浄した後、10%のFCSを含むRPMI-1640培地に浮遊させて、24ウェルプレートにそれぞれ1mlずつ 5×10^5 個の細胞が入るように分注し、48時間培養する。その後、1.5 μ g/mlのジェネチシン(シグマ社)と10% FCSを含むRPMI-1640培地に取り替え、形質転換細胞を選択した。

この中からキメラ抗体を産生している細胞を選択するために、抗ヒトIgG抗体(Cappel lab. inc.)を用いた酵素免疫測定法(EIA)を行った。即ち、抗ヒトIgG抗体(Cappel lab. inc.)をコーティングしたPVC製プラスチックプレート(Falcon3912)に形質転換細胞の培養上清を加え、ペルオキシダーゼ標

識ヤギ抗ヒトIgG(Cappel lab. inc.)を反応させ、TMBZ(3.3'.5.5'テトラメチルベンジジン:同仁化学)で発色させて、キメラ抗体産生細胞を選択、確立した。

(10)抗HIVキメラ抗体遺伝子の発現

このようにして確立したキメラ抗体産生細胞の産生するキメラ抗体の発現状態を調べるため、酵素免疫測定法(EIA)、ウエスタンブロット分析、ノーザンブロット分析を行った。

HIVの外皮膜蛋白gp120、抗ヒト α 1鎖抗体(Cappel lab. inc.)、あるいは抗ヒト κ 鎖抗体(Cappel lab. inc.)をPVC製プラスチックプレート(Falcon 3912)にコーティングした後、上述のDNAで形質転換された形質細胞腫の培養上清を加え、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(Cappel lab. inc.)で反応させた後、TMBZ(3.3'.5.5'テトラメチルベンジジン:同仁化学)で発色させた結果、キメラ抗体を産生している全ての形質転換細胞の培養上清は、HIV外皮膜蛋白gp120と強く反応し、なおかつ抗ヒト α 1鎖抗体及び抗ヒト κ 鎖抗体とも強く反応した。

ヒトC α 1鎖遺伝子、及びヒトC κ 鎖遺伝子をプローブに、ノーザンブロット分析を行った。その結果、第13図に示すようにC β 1細胞において、H鎖では0.5 β VIIとヒトC α 1プローブでそれぞれ約1.8kbの一致したバンドが検出され、一方、L鎖では0.5 β V κ とヒトC κ プローブでそれぞれ約1.3kbの一致したバンドが検出された。このことより、キメラ抗体はmRNAの段階でキメラ化していることが示唆された。

次に、発現されたC β 1抗体の蛋白サイズをウエスタンブロット分析により検討した。C β 1抗体あるいは正常ヒトIgG抗体を、2ME存在下あるいは非存在下でSDS-PAGEを行い、ニトロセルロースフィルター(バイオ・ラッド)へトランスファーした。その後、ヤギ抗ヒトIgG(H+L)抗体(Cappel lab. inc.)を反応させ、次いで、ペルオキシダーゼ標識抗ヤギIgG抗体(Cappel lab. inc.)を作用させ、バイオ・ラッド社のHRP Color Development Reagentを用いて、発色させた。その結果、第14図に示すように、C β 1もヒトIgGもほぼ同じ位置にバンドが検

出た。従って、これらキメラ抗体産生細胞の産生するキメラ抗体は、gp120に対する特異性を持ち、なおかつH鎖もL鎖もヒト型化していることが示唆された。また、ヒトポリクローナルIgGを用いた検量線から、その発現量を推定すると、 1×10^7 個の細胞が10 μ lの培養上清中に約0.5~5 μ g/ μ lの範囲で抗HIVキメラ抗体を産生していることが認められた。実施例(8)で確立した抗HIVキメラ抗体産生細胞の中から、再クローニングにより5~8 μ g/ μ lのキメラ抗体を産生している細胞(C β 1細胞)を選び、以下に述べる実験に使用した。なお、この細胞は、4 \times のスピナーフラスコで1ヶ月間培養しても、その産生量を低下させることはなく、キメラ抗体を安定して産生していた。このような抗HIV中和キメラ抗体を産生する形質転換体C β 1は、微工研菌寄第10100号として本出願人により寄託されている。

次に、キメラ(C β 1)抗体のmRNAが正常に作られているか否かを調べた。C β 1抗体産生細胞及びその親株であるP3X63Ag8-653(P3-653)からmRNAを抽出し、0.5 β VII遺伝子(gH11)、0.5 β V κ 遺伝子(gL41)、

出された。そのサイズは、H $_2$ L $_2$ で約160k、Hで約50k、Lで約28kであった。このことより、このC β 1キメラ抗体は、抗体分子として正常な形をとっているものと思われる。

(11)抗HIVキメラ抗体の活性

今回キメラ化に使用したマウス0.5 β 抗体は、HIVのgp120に対して特異性のある抗体であるが、このキメラ化したC β 1抗体が同様にgp120に対して特異性を示すか否かを、HIV粒子を用いたウエスタンブロット分析で検討した。HIV粒子を可溶化してSDS-PAGEを行い、先述のように、ニトロセルロースフィルターへトランスファーした。このフィルターにマウス0.5 β 抗体、C β 1抗体、ヒト正常血清、及びヒトHIV陽性血清をそれぞれ反応させ、マウス0.5 β 抗体の場合はペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体(Cappel lab. inc.)で、それ以外はペルオキシダーゼ標識ヒトIgG抗体(Cappel lab. inc.)で、HRP Color Development reagent(バイオ・ラッド)を用いて染色した。その結果、第15図に示すように、マウス0.5 β 抗体と同様、C β 1抗体ははっき

りとgp120と反応していることが示された。

次に、このC β 1抗体がHIV感染細胞と反応するか否かを調べた。方法は、HIV感染H9細胞にC β 1抗体を作用させ、ファクスター(ベクトン・デッキンソン)を用いて分析した。第16図に示すように、C β 1抗体は、正常ヒトIgGに比べて蛍光強度がシフトしており、このことより、HIV感染細胞上のgp120抗原をC β 1は認識しているものと思われる。

次に、C β 1抗体のHIV中和活性を検討した。初めに、HIV感染細胞の合胞体形成システムを用い、C β 1抗体の合法体形成阻止能を検討した。即ち、HIVを産生しているLAV感染CEM細胞と未感染のCEM細胞を混合培養すると、24時間後には合法体形成が認められるが、LAV感染細胞をC β 1抗体であらかじめ処理して未感染CEM細胞と混合培養すると、合法体形成が100%抑制された(第17図)。従って、C β 1抗体にはcell to cell感染防御能が期待できる。

次に、C β 1抗体のHIV粒子感染阻止能を検討した。即ち、HIV(LAV)粒子をMT4細胞に感染させ、3日間培養すると、LAV感染の結果生じる巨細胞形成が認

められるが、LAVをC β 1抗体であらかじめ処理しておく、巨細胞形成は認められず、感染が成立しない(第18図)。さらに、このような細胞の中から感染細胞を抗P24モノクローナル抗体(セルラプロダクツ社)を用い間接蛍光抗体法にて測定しても、P24抗原の発現は認められない。従って、C β 1抗体には、HIV粒子感染阻止能があると思われる。前述の2つの結果から、C β 1抗体は、HIV中和活性を有していると思われる。

このように上記(10)、(11)の結果より、HIV外皮膜蛋白gp120と特異的に結合するマウス0.5 β 抗体の可変領域(VH、V κ)を有し、定常領域がヒトIgG抗体(C γ 1、C κ)であるマウスヒトキメラ抗体が、完全な免疫グロブリン(H $_2$ L $_2$)の形で本形質転換細胞(C β 1細胞)から発現産生されていることが証明された。

4. 図面の簡単な説明

第1図および第3図は、それぞれ実施例で調製したVH領域遺伝子およびV κ 領域遺伝子の制限酵素切断点地図である。

例である。

第12図は、抗HIVキメラ抗体H鎖遺伝子およびL鎖遺伝子を含む発現型プラスミドを得る系統図を示したものの一例である。

第13図は、抗HIVキメラ抗体を産生している細胞のmRNAと実施例(2)で調製したVH、V κ 領域遺伝子、及び実施例(3)で調製したヒトC γ 1、C κ 領域遺伝子とのノーザンハイブリダイゼーションの解析結果を示すX線写真の模式図である。

第14図は、抗ヒトIgG抗体を用いた抗HIVキメラ抗体蛋白のウエスタンブロット分析の解析結果を示した模式図である。

第15図は、抗HIVキメラ抗体を用いた可溶化HIV粒子のウエスタンブロット分析の解析結果を示した模式図である。

第16図は、抗HIVキメラ抗体を用いたHIV感染細胞のファクスター分析の解析結果を示している。

第17図は、抗HIVキメラ抗体の合胞体形成阻止活性を示した細胞写真である。

第18図は、抗HIVキメラ抗体のHIV感染阻止活

第2図は、実施例(2)で調製したVH領域遺伝子と54'CB1細胞のmRNAとのノーザンハイブリダイゼーションの解析結果を示すX線写真の模式図である。

第4図は、実施例(2)で調製したV κ 領域遺伝子と54'CB1細胞のmRNAとのノーザンハイブリダイゼーションの解析結果を示すX線写真の模式図である。

第5図および第7図は、それぞれ本発明のVH領域遺伝子およびV κ 領域遺伝子のDNA塩基配列の一例を示したものである。

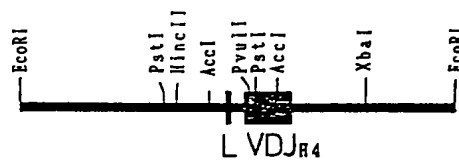
第6図および第8図は、それぞれ本発明のVH領域遺伝子およびV κ 領域遺伝子のアミノ酸配列の一例を示したものである。

第9図は、抗HIVキメラ抗体H鎖遺伝子を含む発現型プラスミドを得る系統図を示したものの一例である。

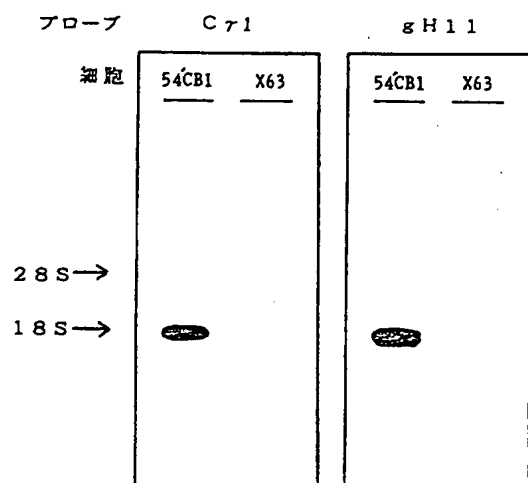
第10図は、抗HIVキメラ抗体L鎖遺伝子を含む発現型プラスミドを得る系統図を示したものの一例である。

第11図は、抗HIVキメラ抗体L鎖遺伝子を含む発現型プラスミドを得る系統図を示したものの一例である。

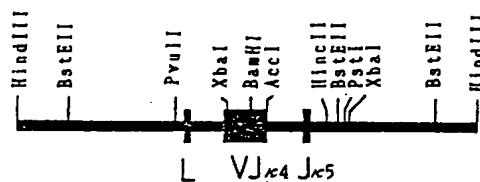
性を示した細胞写真である。



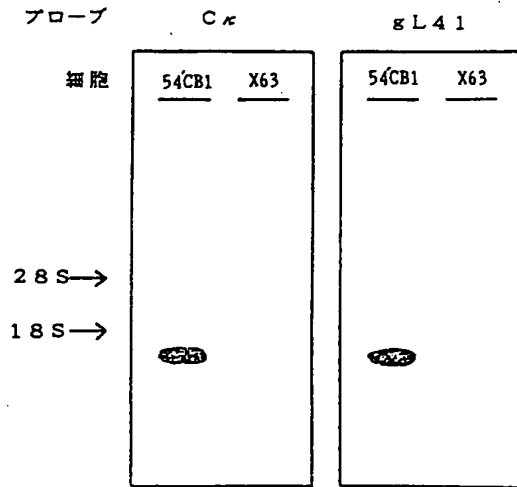
第 1 図



第 2 図



第 3 図



第4図

CTTATCTAAG ATGTACCGTG CTCATGAATA TGCAAAATCCT GTGCACTCAG TGATTATAGA
 GAAGACTGAT CTTATCGGTT TATATAGGGA TGTCTACACC CCACAAAACA TAAGATCAGT
 CTTCTCTATA ATCACTGAGT GCACAGGACC TCACAATGGC GTGGATCTCT ATCATCCTCT
 TCCTAGTGGC AACAGCTATA GGTAAAGGGC TCACAGTTTC AAACCTCAAG AGAGGCCATA
 CATTCTGTG ACATCTACTC TGCCTTTCTC TCCACAGGTG TCCACTCCCA GGTTCAGCTG
 CAGCAGTCTG GGGCTGAGCT GGTGAAGCCT GGGGCCCTAG TGAAGATGTC CTGCAAGGCT
 TTTGGCTACA CCTTCACTAC CTATCCAATA GAGTGGATGA AACAGATCA TGGGAAGAGC
 CTAGAGTGGG TTGGAAATTT TCATCCTTAC AGTGATGATA CTAACACAAA TGAATAATTC
 AAGGGCAAGG CCAAAATTGAC TGTAGAAAAA TCCTCTAGCA CAGTCTACTT GGAGTTCAGC
 CGATTAAACAT CTGATGACTC TGCTGTTTAT TACTGTGCAA TACACTACGG TAGTGCCTAC
 GCTATGGACT ACTGGGGTCA AGGAACCTCA GTCACCGTCT CCTCAGGTTA AGAATGGCCT

_____ はエクソン部分を示す

第5図

Met Ala Trp Ile Ser Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Ile
 Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu
 Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Phe Gly
 Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Pro Ile Glu Trp Met Lys Gln Asn His
 Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Asn Phe His Pro Tyr Ser Asp
Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr
 Val Glu Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Leu Glu Phe Ser Arg Leu
 Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ile His Tyr Gly
Ser Ala Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
Val Ser Ser

_____ はN末アミノ酸: _____ は本発明の特異配列

第6図

CTTGGAGCAA CAGCACATAC TCTGCTGATT TGCATATGAA ATAATTTTAT AACAGCCCAG
 GCTTCTTTAA GGCAGCTGCC AGGAGCCTAA GAAGCATCCT CTCATCTAGT TCTCAGAGAT
 GGAGACAGAC ACAATCCTGC TATGGGTGCT GCTGCTCTGG GTTCAGGTG AGAGTCAGA
 GAAGTGTGG GAGCAACCTC TGCGACCATC ATGACTTTCC ATGCATATGG ACTCCTGAAT
 GTTATAATTA ATACATTTGT AATTGGTTTT AAGTTTCCTG ATTCCCTTTC ATTTCCTGAT
 GTCTCATATT GATGTCCACA GTATTCCTTA TATTTTAA TGAATGGGA AGTCCTTTAT
 ACATATATAA CAATTGTCTG TGTGTTTATC ATTCCAGGCT CCACTGGTGA CATTTGCTG
ACCCAATCTC CAGCTTCTTT GGCTGTGCT CTAGGGCAGA GGGCCACCAT CTCCTGCAAG
 GCCAGCCAAA GTGTGATTA TGATGGTAT AGTTATATGA ACTGGTACCA ACAGAAACCA
 GGACAGCCAC CCAAACTCCT CATCTATGCT GCATCCAATC TAGAATCTGG GATTCCAGCC
 AGGTTTAGTG GCAGTGGGTC TAGGACAGAC TTCACCTCA ACATCCATCC TGTGGAGGAG
 GAGGATGCTG CAACCTATTA CTGTCAGCAA AGTAATGAGG ATCCATTCAC GTTCGGGCTG
 GGGACAAAGT TGGAAATAAA ACGTAAGTAG ACTTTGCTC ATTTACTTAT GACGTTTTGG

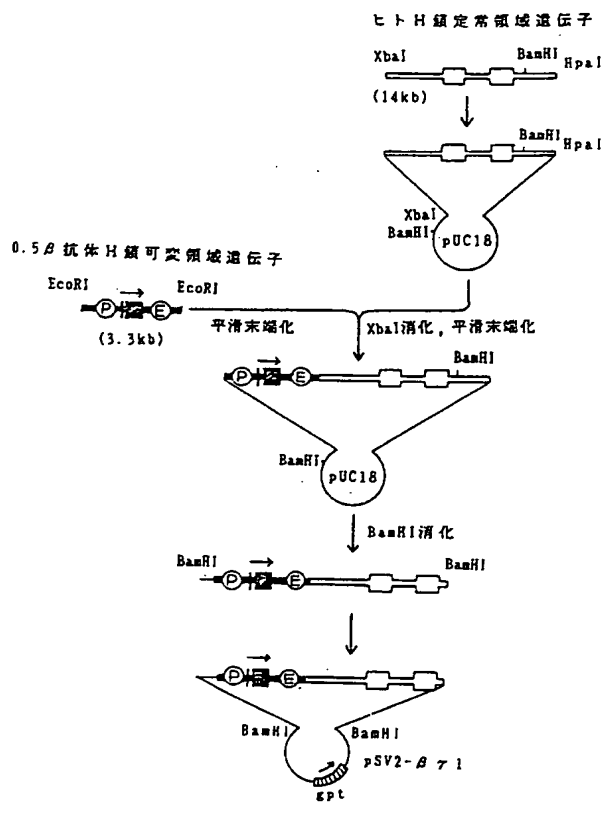
_____ はエクソン部分を示す

第7図

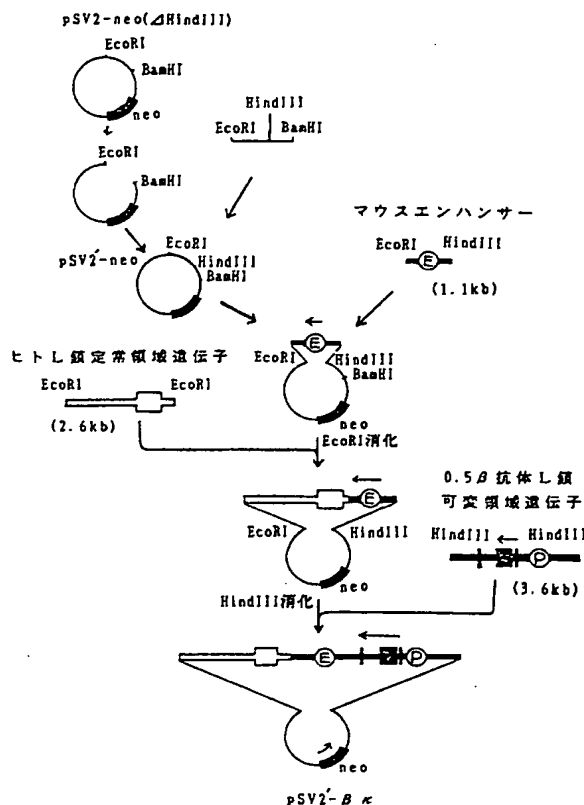
Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val
Pro Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser
Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala
Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr
Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala
Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

_____はN末アミノ酸配列分析で確認された配列
_____は本発明の特異配列

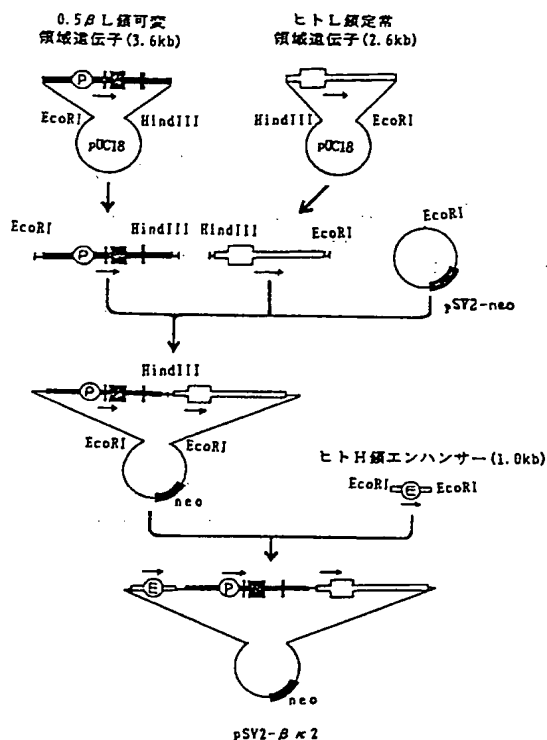
第8図



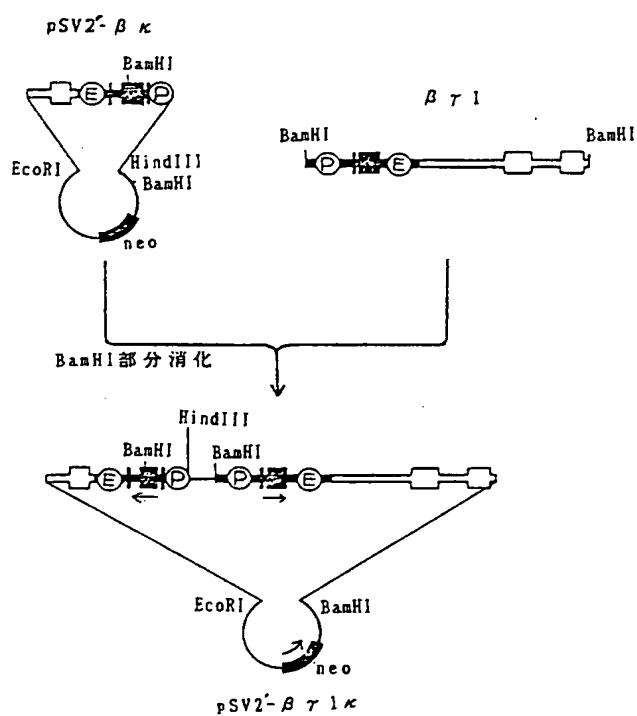
第 9 回



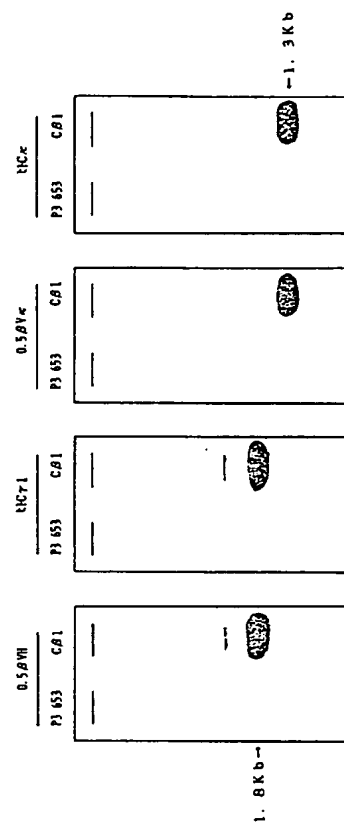
第 10 图



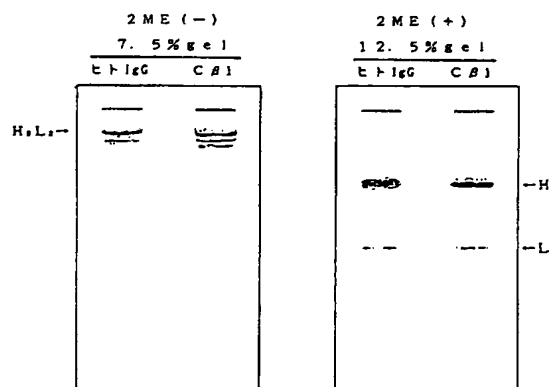
第 11 回



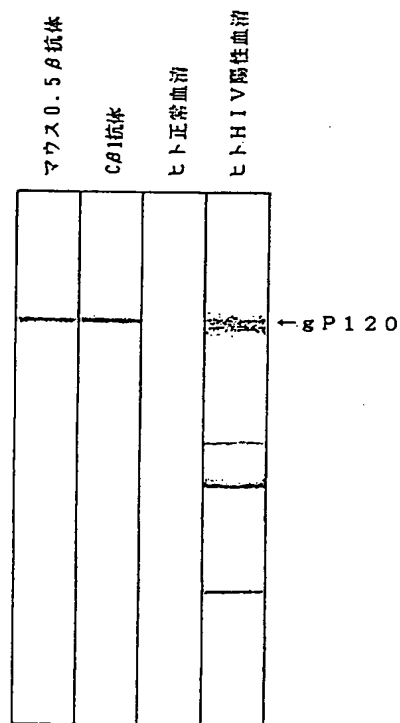
第 12 図



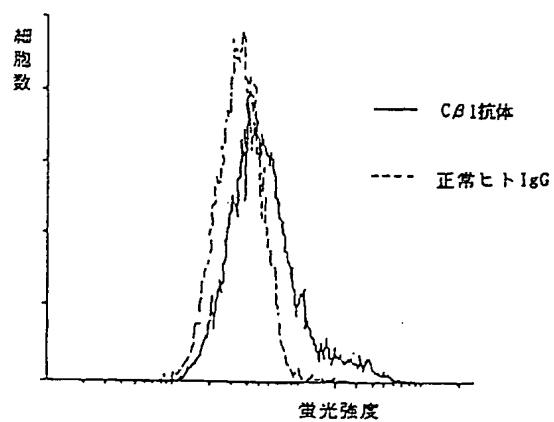
第 13 図



第 14 図

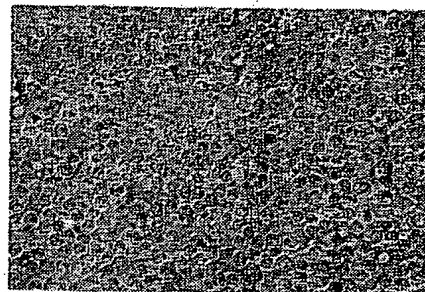


第 15 図

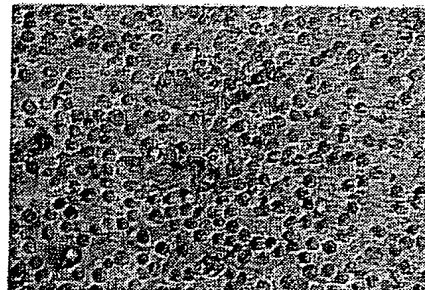


第16図

Cβ1抗体存在下(倍率X100)

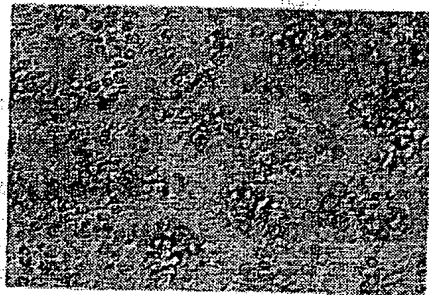


Cβ1抗体非存在下(倍率X100)

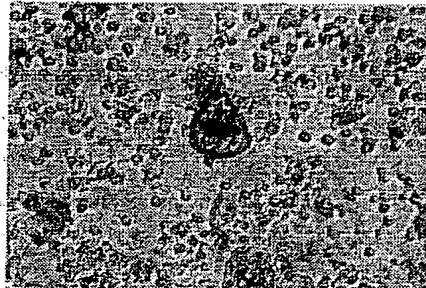


第17図

Cβ1抗体存在下(倍率X100)



Cβ1抗体非存在下(倍率X100)



第18図

第1頁の続き

⑤Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

//(C 12 N 15/13
C 12 R 1:91)
(C 12 P 21/08
C 12 R 1:91)

⑦発明者 松下 修三 熊本県熊本市水前寺2-22-22
⑦発明者 服部 俊夫 熊本県熊本市新大江1-14-10 ライオンズマンション新
大江104号
⑦発明者 高 月 清 熊本県熊本市渡鹿1丁目16-3-54

手続補正書(方式)

平成元年 1月 日

特許庁長官 吉田文毅殿

1. 事件の表示

昭和63年 特許願第 171385号

2. 発明の名称

抗HIV抗体可変領域をコードする遺伝子断片および
これらを用いて発現された抗HIVキメラ抗体ならび
にその製法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 熊本県熊本市清水町大窪668番地
名称 財団法人 化学及血清療法研究所
代表者 野中 賢 男

4. 代理人

住所 熊本県熊本市清水町大窪668番地
財団法人 化学及血清療法研究所内
〒860 電話 096(344)1211
氏名 井理士(8767) 岡井

5. 補正命令の日付(発送日)
昭和63年9月27日

6. 補正の対象

委任状、明細書の図面の簡単な説明の欄および
図面

7. 補正の内容

- (1) 特許法第42条の2第1項の優先権主張に関する
委任状を別紙の通り補充する。
(2) 明細書第54頁18行目から第55頁第1行目までの
第17図および第18図の説明を下記の通り補
正する。

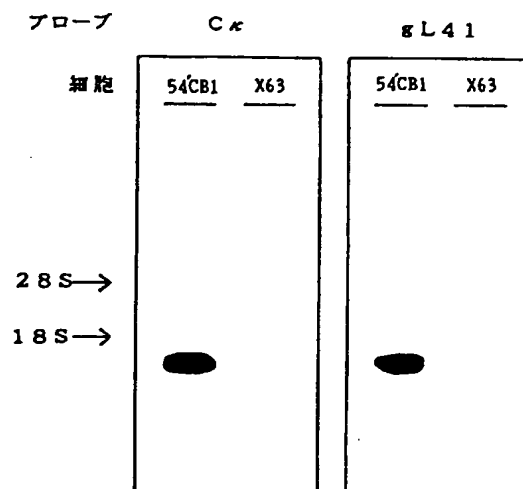
「第17図は、CB1抗体存在下においてLAV感染
CEM細胞と未感染CEM細胞を混合培養した場合のCE
M細胞(生物)の形態、およびCB1抗体非存在下にお
いてLAV感染CEM細胞と未感染CEM細胞を混合培養
した場合のCEM細胞(生物)の形態を示す顕微鏡写
真である。

第18図は、CB1抗体存在下においてLAVをMT4
細胞に感染させた細胞を3日間培養した場合のMT4
細胞の形態、およびCB1抗体非存在下においてLAV

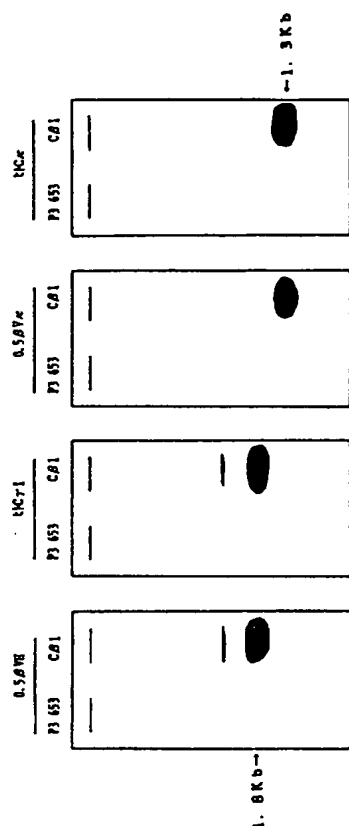
をMT4細胞に感染させた細胞を3日間培養した場合のMT4細胞(生物)の形態を示す顕微鏡写真である。」

(3) 第4図、第13図、第14図および第15図を別紙のとうり補正する。

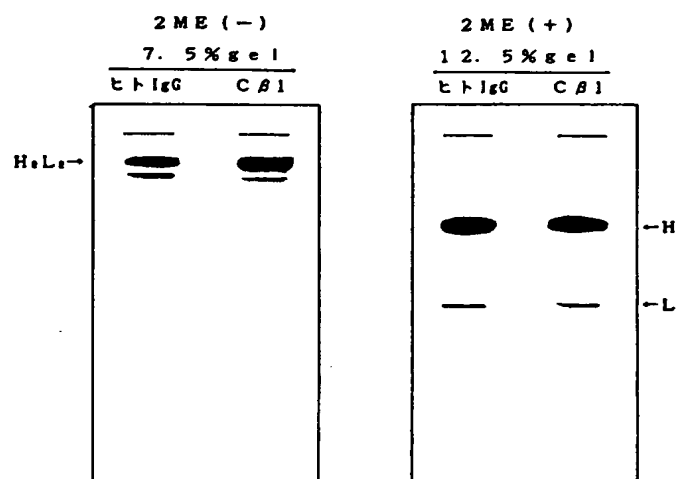
(第17図ならびに第18図の補正の理由は、上記(2)の図面の簡単な説明の欄の補正により解消したものと確信いたします。)



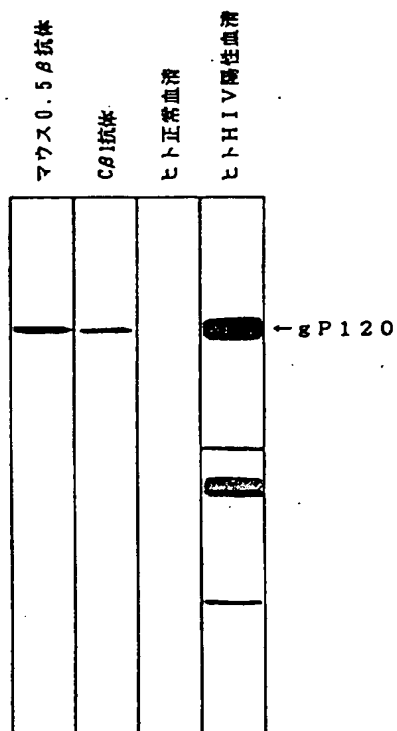
第4図



第13図



第14図



第15図